

# 黒麹菌を用いた甘柿成熟果および渋柿成熟果の発酵とその機能性

折居 千賀

## Comparison of the Functionality of Persimmons Fermented with *Aspergillus awamori*

Chika Orie

The current authors previously found that using *Aspergillus awamori* to ferment young unripe 'Fuyu' persimmons resulted in enhanced functionality, e.g. increased inhibition of  $\beta$ -lipase. Therefore, the current study investigated fermentation of sweet 'Fuyu' persimmons and four varieties of astringent persimmons: 'Saijo,' 'Atago,' 'Ichita,' and 'Hiratanenashi.' In contrast to fermented young unripe 'Fuyu' persimmons, fermented mature persimmons had only slightly increased level of  $\beta$ -lipase inhibition. Fermentation of 'Saijo' persimmons resulted in increased inhibition of  $\beta$ -lipase and angiotensin-converting enzyme (ACE) and increased DPPH radical scavenging activity and total polyphenol. 'Ichita' and 'Hiratanenashi' persimmons had only increased inhibition of  $\beta$ -lipase and ACE. In contrast, fermentation of 'Atago' persimmons resulted in decreased functionality except for inhibition of ACE. LC-MS analysis indicated that components of unfermented astringent persimmons differed among the varieties. This suggests that differences in components affects the enhancement or diminishment of functionality as a result of fermentation. These results indicate that methods used to ferment young unripe sweet persimmons can be used to ferment unripe astringent persimmons.

**Key words:** persimmon, *Aspergillus awamori*, astringent persimmon, inhibition of  $\beta$ -lipase

### 1. 背景及び目的

柿 (*Diospyros kaki*) は中国を原産とする果物で、食用や薬あるいは染料や塗料として用いられてきたなじみ深い果物である。柿は完全甘柿、不完全甘柿、渋柿に分類され、日本では富有柿、次郎柿、市田柿など様々な品種が存在する。現時点での柿の生産量は22万トンとされ、世界第3位の生産量である。しかし、柿は加熱処理に不向きで生食、干柿として消費されることが多く、他の果物に比べて消費形態は多様ではない。また、毎年2割程度は摘果した果実や規格外果実が発生すると推定され、それらの処分にはコストがかかる。しかし柿は、葉に抗アレルギー成分であるアストラガリン<sup>1)</sup>、蒂はトリテルペノイド類を含み、しゃっくり止めの漢方薬として利用されている<sup>2)</sup>。果実や果皮には抗肥満に関与するとされる $\beta$ -クリプトキサンチンといった機能性成分を含有している<sup>3)</sup>。また、柿にはタンニンをはじめとした柿ポリフェノールが含まれている<sup>4)</sup>。すなわち、柿そのものが機能性食品であるが、消費形態の少なからず未利用資源としての側面もあわせ持つ現状がある。このため、柿を有効活用する試みとして、その機能性に注目した様々な研究がなされてきた。発酵については、柿果実由来の乳酸菌を用いた柿シロップ乳酸発酵飲料<sup>5)</sup>や、柿を乳酸発酵させたものを、豚の飼料として用い、疾病を予防するといった試みがなされている<sup>6)</sup>。しかし、

柿の発酵に用いられる微生物の多くは乳酸菌や酵母、酢酸菌である。そこで我々は柿の発酵に関する報告がなかった黒麹菌に注目した。我々はこれまでに黒麹菌を用いて富有柿幼果の簡易な固体発酵法を確立し、発酵により機能性が増強したことを報告した<sup>7)</sup>。富有柿幼果の黒麹菌発酵物は、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性(吸収阻害型抗肥満)、ACE阻害活性(血圧上昇抑制)が増強されたため、同発酵物が機能性素材として活用できる可能性を示した。また、富有柿幼果発酵物について加熱を用いた殺菌処理に関する検討を行った結果、加熱条件下においても機能性は維持され、条件によっては増強することを報告した<sup>8)</sup>。しかしこれまでは富有柿幼果のみを対象とした検討であり、確立した固体発酵法が富有柿の成熟果やその他渋柿にも適用可能かどうかは不明であった。そこで、富有柿成熟果、渋柿4種(西条、平核無、愛宕、市田)に対して黒麹菌を用いた発酵を同様に行い、各種機能性及び成分を調べたので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1. 使用菌株

発酵菌は黒麹菌 (*Aspergillus awamori* NBRC4033) を用いた。これらはNBRC (Biological Resource Center, NITE) より購入した。

## 2.2. 発酵原料

原料は甘柿より富有柿幼果, 富有柿成熟果, 渋柿からは西条柿, 愛宕柿, 平核無, 市田柿を選択した。富有柿幼果および成熟果, 西条柿, 愛宕柿, 市田柿, 平核無は奈良県農業開発センターの協力のもと, 9月~11月にかけてサンプリングを行ったものを用いた。これらのサンプルは収穫後, 皮, へた, 果肉, 種に分け, 部位ごとにまとめ, -20℃で保存した。発酵には果肉を用いた。

## 2.3. 発酵法

各試料の果肉部約40gを100℃の熱水で5秒間煮沸処理し, 滅菌済みビーカーに移した。一部をサンプリングし, 未発酵の試料(0日目)とした。その後, 滅菌済みステンレス鉢にて細断した試料を滅菌済み試験管あるいは300mlバツフルフラスコに移し, 通気性があるシリコ栓で密封した。種菌は黒麹菌をポテトデキストロース寒天斜面培地(Difco Laboratories)で35℃, 3日間培養したものをを用いた。滅菌水10mlで懸濁後, 胞子懸濁液2.0mlを幼果に添加し, 好気条件下, 35℃で7日間発酵を行った。同発酵におけるN数はそれぞれ3とした。

## 2.4. 抽出法

発酵終了後, 水を用いて4℃, 4日間抽出を行った。抽出液を減圧乾固したのち10%(w/v)となるようにそれぞれの溶媒に再溶したものを試料溶液とした。得られた試料溶液をβ-リパーゼ阻害活性, アンジオテンシン変換酵素阻害活性, ポリフェノール量の測定, DPPHラジカル消去活性, LC/MS分析に供した。

## 2.5. β-リパーゼ阻害活性測定

測定法は既法のものの一部改変して用いた<sup>9)</sup>。基質は4-メチルウンベリフェロンのオレイン酸エステル(4-MUO)を用い, 精製した4-メチルウンベリフェロン(4-MU)の蛍光を測定することにより実施した。基質溶液および酵素液の調製には150mM NaClと1.36mM CaCl<sub>2</sub>を含む13.0mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0, 緩衝液A)を用いた。活性測定は以下の通りに実施した。水で適宜希釈した試料25μlを96穴マイクロプレートに添加後, 基質(0.1mM 4-MUO DMSO溶液を緩衝液Aにて10000倍に希釈したものを)50μl添加, 37℃で5分間プレインキュベートした。酵素は豚膵臓由来β-リパーゼを用い, 酵素液(0.5mg/ml)を25μl添加後, 37℃で30分酵素反応を行った。反応終了後, 0.1Mクエン酸ナトリウム(pH 4.2)緩衝液を50μl添加し, 反応を停止させた。遊離した4-メチルウンベリフェロンの蛍光(励起波長35.5nm, 蛍光波長46.0nm)を蛍光プレートリーダー(FLUOstar Optima, BMG LABTECH社)で測定した。空試験区として, 基質および試料を加えて37℃, 30分静置し, クエン酸緩衝液を添加したのちに酵素液を加えたものを準備した。試料の代わりに水を添加, 同様の反応を行ったものを対照区とし

た。対照区に対する試験区の残存活性より阻害率を求め, 50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>, μg/ml)を算出した。残存活性は以下の式によって求めた。

$$\text{残存活性 (\%)} = \left\{ \frac{(\text{試験区 4-MU 量} - \text{空試験区 4-MU 量})}{\text{対照区 4-MU 量}} \right\} \times 100$$

## 2.6. アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定

阻害活性は, ACE kit-WSTを用いて調べた。付属のマニュアルに従い各抽出物のACE阻害活性を測定した。同キットは3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly(3HB-GGG)より遊離した3-Hydroxybutyric acid(3HB)を酵素法にて検出する方法である。測定は96穴プレートを用い, 分光光度計(μQuant, BIO-TEK社)にて450nmの吸光度を測定した。付属のマニュアルに従い阻害率を求め, 50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。

## 2.7. DPPHラジカル消去活性

抗酸化活性の定量は既報に従った<sup>10)</sup>。試料溶液を適宜希釈後, 96穴プレートに100μl添加した。0.2M DPPHエタノール溶液100μl添加したのち攪拌, 混合した。室温で30分静置し, 520nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(μQuant, BIO-TEK社)で測定した。このとき, 標準試薬としてTroloxを用いた。検量線を作成したのち, 抗酸化能をTrolox相当量(μmol-trolox相当量/1.0g)で算出した。

## 2.8. 総ポリフェノール量測定

ポリフェノール量の定量は, 既報に従いフォーリン・チオカルト法を用いた<sup>11)</sup>。適宜希釈した試料溶液90μlに50%フォーリン・チオカルト溶液を450μl添加し, 攪拌した。3分静置したのち, 0.4M炭酸ナトリウム水溶液を450μlを添加し, 55℃で5分間反応を行った。反応後30分間放冷し, 反応液を96穴プレートに分注し, 765nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(μQuant, BIO-TEK社)で測定した。没食子酸エタノール溶液を用いた検量線を作成し, 試料1.0gあたりの没食子酸相当量(mg-没食子酸相当量/1.0g)として算出した。

## 2.9. 発酵物抽出液のLC/MS分析

発酵物抽出液のLC/MS分析は, 試料液をフィルターろ過したのち, ポジティブイオンモードで測定した。LC/MS装置はAgilent Technologies 6430 triple Quad LC/MS(アジレントテクノロジー社), カラムは逆相カラムのScherzo SS-C18(150mm×2mm-i.d., 粒径3μm, Imtakt社), 移動相としてA液は酢酸とギ酸をそれぞれ0.2%となるように添加した水溶液, B液は200mM酢酸アンモニウム水溶液とメタノールを1:1(v/v)で混合したものをを用いた。流速は0.3ml/min, カラム温度は45℃に設定した。B液2%で3分間保持したのち, B液を11分かけて2%から45%に上げ, 10分かけてB液を100%まで上げるグラジエントプログラムとした。注入量は3μl

とした。イオン化はESI (Electrospray Ionization) 法で、走査範囲は  $m/z$  100-1000, フラグメンター電圧を 100 V, 乾燥窒素ガス (350°C) を毎分 10 L, ネブライザー圧を 55 psi, キャピラリー電圧は 4000 V とした。

### 3. 結果

#### 3.1. 黒麹菌による発酵時の変化

黒麹菌はいずれの成熟果においても良好な生育がみられた。黒麹菌は渋柿のタンニン存在下でも生育が阻害されないことを示した。いずれの成熟柿も、富有柿幼果で見られたような果肉の色の変化、あるいは軟化や溶解といった現象は見られなかった。また、柿幼果の発酵物と同様に発酵にともなう悪臭の発生はみとめられなかった。

#### 3.2. 柿発酵物の $\beta$ -リパーゼ阻害活性

各発酵物の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性を測定し、比較した (表 1)。値は低ければ低いほど高い阻害活性を有することを示す。富有柿成熟果は発酵により  $\beta$ -リパーゼ阻害活性が約 3 倍に増加したが ( $IC_{50}=6390.5 \pm 1576.3 \mu\text{g/ml}$ )、幼果と比較すると低い阻害活性にとどまった。西条柿 ( $IC_{50}=11.1 \mu\text{g/ml} \pm 3.9$ ) や平核無 ( $IC_{50}=131.5 \mu\text{g/ml} \pm 24.0$ ) では発酵により機能性が増強した。市田柿は未発酵状態では  $\beta$ -リパーゼ阻害活性を示さなかったが、発酵によって阻害活性を示した ( $IC_{50}=451.5 \mu\text{g/ml} \pm 389.0$ )。一方、愛宕柿では未発酵の状態でも高い  $\beta$ -リパーゼ阻害活性 ( $IC_{50}=7.1 \mu\text{g/ml}$ ) を有していたが、発酵による機能性の増強は見られなかった。

表 1 甘柿および渋柿成熟果発酵物の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性

試料名	$\beta$ -リパーゼ阻害活性 ( $IC_{50}=\mu\text{g/ml}$ )	
	0 日目	7 日目
富有柿 (幼果)	246.8	28.0 $\pm$ 10.3
富有柿 (成熟果)	19326.7	6390.5 $\pm$ 1576.3
西条柿 (成熟果)	1922.6	11.1 $\pm$ 3.9
愛宕柿 (成熟果)	7.1	8.9 $\pm$ 4.3
平核無 (成熟果)	1125.2	131.5 $\pm$ 24.0
市田柿 (成熟果)	—	451.5 $\pm$ 389.0

#### 3.3. 柿発酵物の ACE 阻害活性

各発酵物の ACE 阻害活性を測定し、比較した (表 2)。値は低ければ低いほど高い阻害活性であることを示す。富有柿幼果とは異なり、富有柿成熟果は発酵前および発酵後において ACE 阻害活性を示さなかった。愛宕柿は、未発酵状態で ACE 阻害活性 ( $IC_{50}=621.5 \mu\text{g/ml}$ ) を有し、発酵によって阻害活性が増強する傾向を示した ( $IC_{50}=556.4 \pm 20.2 \mu\text{g/ml}$ )。西条柿、平核無、市田柿では、未発酵状態において ACE 阻害率がいずれも約 40% と弱い阻害活性であったが、いずれも発酵による増強が見られた。

表 2 甘柿および渋柿成熟果発酵物の ACE 阻害活性

試料名	ACE 阻害活性 ( $IC_{50}=\mu\text{g/ml}$ )	
	0 日目	7 日目
富有柿 (幼果)	743.5	363.5 $\pm$ 77.3
富有柿 (成熟果)	—	—
西条柿 (成熟果)	—	667.1 $\pm$ 17.1
愛宕柿 (成熟果)	621.5	556.4 $\pm$ 20.2
平核無 (成熟果)	—	698.8 $\pm$ 25.2
市田柿 (成熟果)	—	573.2 $\pm$ 60.7

#### 3.4. 柿発酵物の総ポリフェノール量

各発酵物の総ポリフェノール量を測定し、比較した (表 3)。発酵にともなう総ポリフェノール量の増加が見られたのは西条柿 ( $2.7 \pm 0.5 \text{ mg- 没食子酸相当量 /1.0 g}$ ) であった。富有柿成熟果、平核無および市田柿では増強は見られなかった。一方、愛宕柿では発酵にともなうポリフェノール量の減少 ( $3.9 \pm 0.5 \text{ mg- 没食子酸相当量 /1.0 g}$ ) が見られた。渋柿における発酵時のポリフェノール量の変化は品種によって相違が見られた。

表 3 甘柿および渋柿成熟果発酵物の総ポリフェノール量

試料名	ポリフェノール量 ( $\text{mg- 没食子酸相当量 /1.0 g}$ )	
	0 日目	7 日目
富有柿 (幼果)	2.5	5.1 $\pm$ 0.2
富有柿 (成熟果)	1.2	1.3 $\pm$ 0.08
西条柿 (成熟果)	0.7	2.7 $\pm$ 0.5
愛宕柿 (成熟果)	8.9	3.9 $\pm$ 0.5
平核無 (成熟果)	1.3	1.1 $\pm$ 0.1
市田柿 (成熟果)	1.3	0.6 $\pm$ 0

#### 3.5. 柿発酵物の DPPH ラジカル消去活性

各発酵物の DPPH ラジカル消去活性を測定し、比較した (表 4)。各発酵物の DPPH ラジカル消去活性はポリフェノール量と同じ傾向を示した。発酵により DPPH ラジカル消去活性が増加したのは西条柿 ( $243.1 \pm 17.7 \mu\text{mol- トロロックス相当量 /1.0 g}$ ) で、発酵にともなう減少がみられたのは愛宕柿であった。西条柿および愛宕柿ではポリフェノール量と DPPH ラジカル消去活性に關与する化合物に何らかの關連がある可能性を示唆した。

表 4 甘柿および渋柿成熟果発酵物の DPPH ラジカル  
消去活性

試料名	DPPH ラジカル消去活性 ( $\mu\text{mol}$ -トロロックス相当量 /1.0 g)	
	0 日目	7 日目
富有柿 (幼果)	2.5	$5.1 \pm 0.2$
富有柿 (成熟果)	24.6	$25.9 \pm 0.6$
西条柿 (成熟果)	124.3	$243.1 \pm 17.7$
愛宕柿 (成熟果)	1487.9	$250.7 \pm 6.0$
平核無 (成熟果)	169.4	$162.1 \pm 8.3$
市田柿 (成熟果)	130.6	$116.8 \pm 6.0$

### 3.6. 各発酵物の LC/MS 分析

柿発酵物の抽出液について LC-MS 分析を行い、比較した。得られたクロマトグラム上で相違が顕著であった前半部分を抜粋して図 1 および図 2 に示した。富有柿幼果と成熟果において、発酵 0 日目のクロマトグラムにて検

出されたピークに相違が見られ、それぞれが含有する成分が異なることを示した (図 1)。いずれも発酵にともなうピークの消失が見られたが、発酵 7 日目でのクロマトグラムにおいて顕著なピークの差は見られなかった。同様に、渋柿発酵物抽出液について LC-MS 分析を行った。未発酵 (0 日目) の抽出液を比較すると、保持時間 2.0 min ~ 10.0 min において検出されたピークは品種による相違が見られた (図 2)。このことは、渋柿の品種ごとに出発物質となる成分の種類や含有量に相違があることを示した。これらのピークの中には発酵によって消失するものと、発酵によって新たに出現するものとに分かれた。西条柿および愛宕柿では 5.0 min から 10.0 min の間に検出されたピークの多くが発酵にともない消失した。市田柿でもピークの消失が見られたが、発酵後のクロマトグラムで検出されたピークは西条柿や愛宕柿とは異なっていた。平核無は発酵後、新たなピークが検出された。このことから、渋柿においては品種毎に発酵生成物が異なる、もしくは異なる代謝系で発酵が行われている可能性が示唆された。

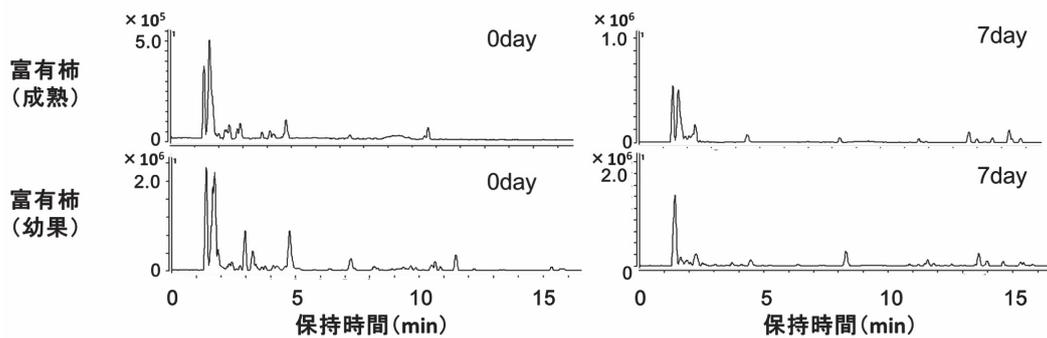


図 1 富有柿幼果発酵物抽出液および成熟果発酵物抽出液の LC/MS 分析

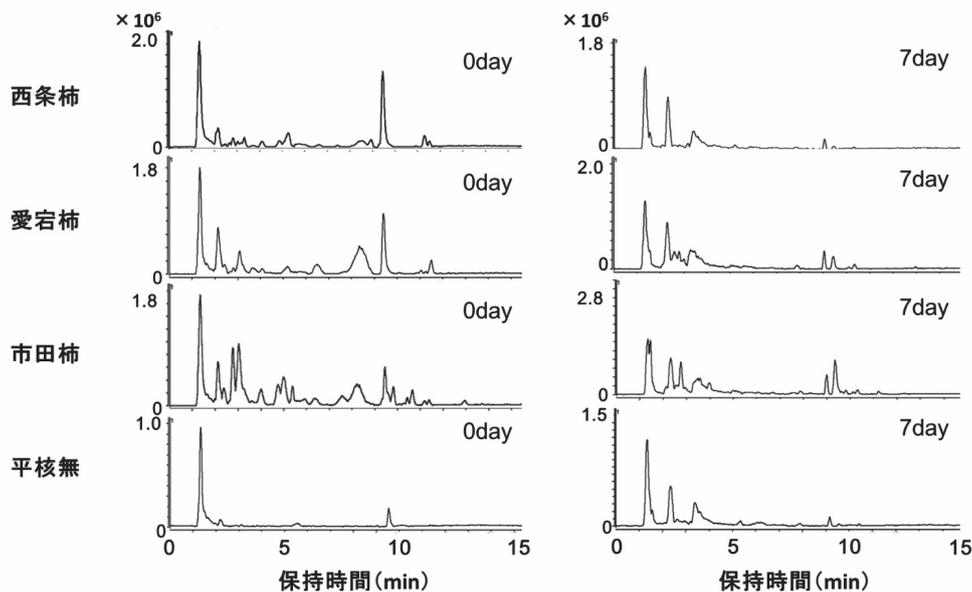


図 2 渋柿発酵物抽出液の LC/MS 分析

#### 4. 考察

これまで、黒麹菌を用いた富有柿幼果の発酵および発酵にもなる機能性の増強を調べ、様々な検討を行ってきた。確立した発酵法が富有柿成熟果や渋柿の他品種に適用可能かどうかを調べることは柿の利用形態の多様化という試みの上で重要であった。富有柿では黒麹菌は幼果を素材とした時は、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性や ACE 阻害活性が増強したが、成熟果では $\beta$ -リパーゼ阻害活性のみ弱い活性の増加が見られた。LC/MS 分析の結果、発酵前の幼果と成熟果では含有する成分に相違が見られた。このことは、発酵時の出発物質が幼果と成熟果で異なることを示すものであったが、発酵後のクロマトグラムにおいては顕著な相違が見られなかった。しかし、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性の増強では両者に顕著な差が見られたことから、今回の分析では検出できなかった成分が活性の増強に関与した可能性が考えられた。これらのことより、富有柿においては発酵による機能性増強は幼果にのみ適用できることが示唆された。しかし、富有柿成熟果の発酵液は発酵によって従来の甘さに酸味が加わった味を呈したことから、機能性の増強は顕著ではなかったが、発酵による風味の変化という点では成熟果についても検討の余地があると考えられる。

一方、渋柿成熟果を素材とした場合は、各種機能性の増強および成分において品種ごとに相違が見られた。 $\beta$ -リパーゼ阻害活性では西条、市田および平核無において機能性の増強が見られ、元から高い阻害活性を有している愛宕柿では活性がやや減少した。ACE 阻害活性ではそれぞれの柿について阻害活性の増加が見られ、ポリフェノール量や DPPH ラジカル消去活性では西条柿のみ増加した。これらの傾向をまとめると、市田および平核無ではリパーゼ阻害活性および ACE 阻害活性のみが増強し、富有柿幼果発酵物と同じ傾向を示した。西条柿はこれら 4 種の機能性について増強を示したが、愛宕柿では ACE 阻害活性を除き、活性が減少した。愛宕柿の LC/MS 分析において未発酵時に検出されたピークの中には発酵にともない消失したものも見られた。また、愛宕柿は $\beta$ -リパーゼ阻害活性やポリフェノール量および DPPH ラジカル消去活性が他の柿よりも高い値を示しており、果実そのものが高い阻害活性や機能性を有していた。これらのことより、愛宕柿があらかじめ含有していた機能性成分が発酵の影響を受け、減少あるいは消失した可能性が考えられた。さらに、各渋柿の含有する成分あるいはその成分量は品種によって著しく異なっていた。このことは、黒麹菌による発酵において、代謝系や代謝産物、化合物変換のタイミングに大きく影響を与えたことが考えられた。それらの結果、渋柿成熟果を素材とした黒麹菌による発酵は、品種ごとに機能性の増強傾向の相違に至ったことが考えられた。

今回の検討では黒麹菌を用いた発酵法は渋柿である西条、市田および平核無において機能性を増強することが示された。しかし、機能性の増強および傾向は品種ごとに異なっていた。このことは、渋柿においては品種ごとの検討

が必要であることを示したが、得られる機能性成分もまた多様である可能性を示すものであった。

#### 5. 参考文献

- 1) 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 新本洋士, 農産物のラジカル消去能の検索, 日本食品科学工学会誌, 49, 257-266, (2002)
- 2) 松浦信, 飯沼宗和, 資源植物の成分研究 (第 4 報) 柿帯の成分について その 1, 薬学雑誌, 97, 452-455, (1977)
- 3) Izuchi R, Nakai Y, Takahashi H, Ushiyama S, Okada S, Misaka T, Abe K., Hepatic gene expression of the insulin signaling pathway is altered by administration of persimmon peel extract: a DNA microarray study using type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, *J. Agric. Food Chem.*, 59,3320-3329, (2011) .
- 4) 中林敏郎, 果実および野菜類のタンニン成分 (第 7 報) 甘柿と渋柿のタンニン組成の相違, 日本食品科学工学会誌, 18, 33-37, (1971)
- 5) 上田 京子, 樋口 智子, 平野 吉男, 塚谷 忠之, 末永光, 齋藤 浩之, 横溝 雅和, 柿果実由来乳酸菌を用いた柿シロップ乳酸発酵飲料の開発, 日本食品科学工学会誌, 63, 78-85, (2016)
- 6) 亀岡俊則, 中野長久, 庄條愛子, 細谷圭助, 藤田永治, 養豚の疾病予防効果の高い柿高密度乳酸発酵飼料の開発, 畜産の研究, 66, 707-710, (2012)
- 7) 折居千賀, 黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵による富有柿幼果の機能性向上, 日本栄養・食糧学会誌, 68, 225-232, (2015)
- 8) 折居千賀, 富有柿幼果黒麹菌発酵物の機能性に対する熱処理の影響, 日本防菌防黴学会誌, 45, 251-257 (2017)
- 9) 小島芳弘, 村中隆 (2012) カワラケツメイに含まれる新規タンニンおよびそのリパーゼ阻害活性, 日本食品科学工学会誌, 59, 279-283
- 10) 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 老田茂, 農産物におけるラジカル消去能と総ポリフェノール量に関する一考察 (2005) 東北農業研究, 58, 237-238.
- 11) 久本雅嗣, 市川茉莉枝, 依田諭, 小林浩武, 奥田徹 (2011) オンライン DPPH-HPLC 法によるブドウ種子フェノール中の抗酸化化合物の探索, ASEV 日本ブドウ・ワイン学会誌, 22, 3-9.